

체외 배양액의 조성과 혈청의 첨가가 한우 체외 수정란의 발달과 임신율에 미치는 효과

최수호¹, 박용수¹, 이준희³, 강태영⁴, 김주현², 노규진^{2,*}

¹경상북도 축산기술연구소, ²경상대학교 수의과대학, ³경상대학교 농업생명과학대학, ⁴제주대학교 수의학과

Development a Following of Serum Addition *In Vitro* Culture and Embryo Transfer

Soo Ho Choi¹, Yong Soo Park¹, Joon Hee Lee², Tae Yeong Kang³, Joo Heon Kim⁴ and Gyu Jin Rho^{4,*}

¹Gyoung-buk National Livestock Research Institute

²Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

³College of Veterinary Medicine, Cheju National University

⁴College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

ABSTRACT

The present study investigated the efficient methods to produce *in vitro* Hanwoo embryos, and to improve the pregnancy rate. The developmental rate, total cell number and ICM ratio of *in vitro* embryos were compared amongst different culture media. Comparisons were also made on the status of recipients, pregnancy rate along with day of transfer after the estrus. Development of embryos into blastocyst stage in IVMD101 supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) group was significantly higher (34.2%) than that of TCM-199 supplemented with 5% FBS (26.8%) and IVMD101 without FBS (25.9%) ($p < 0.05$). The development rate to blastocyst stage was significantly faster in IVMD101(5% FBS) than that of other groups (0.2~2.3%) ($p < 0.05$). The average number of inner cell mass and trophoctoderm were similar among treatment groups, which were 36.0~44.7 and 83.3~106.7. However, total cell number in IVMD101(5% FBS and 0% FBS) was significantly higher than that of TCM199(5% FBS).

There were no differences in the pregnancy rate among treatment groups (32.0%, 33.9% and 28.6%, respectively). However, the pregnancy rate of Day 6 embryos cultured in IVMD101(5% FBS) was significantly ($p < 0.01$) higher than IVMD101 without FBS and TCM-199 + 5% FBS (38.0% vs. 17.2% and 32.4%, respectively). No significant difference was observed for the pregnancy rate between heifer and cow transferred with Day 6 embryos cultured in IVMD 101(5% FBS) (42.7% and 39.3%, respectively). However, there was a significant difference of pregnancy rate ($p < 0.05$) in heifer between one and two embryos transferred (31.4% and 41.9%). There was no difference of pregnancy rate among transfer days after estrus between heifer and cow, but the pregnancy rate of transfer to heifer with day 6 after estrus was significantly higher ($p < 0.05$) than that of day 7 and 8 (22.2% vs. 49.0% and 38.7% respectively).

Based on the above findings, there is a possibility to produce *in vitro* produced embryos cultured in IVMD101(5% FBS) showed higher blastocyst rate and the increased cell number. In terms of the pregnancy rate of *in vitro* produced embryos, the highest pregnancy rate was observed when two embryos were cultured in IVMD101(5% FBS) and transferred.

(Key words : *in vitro* embryos, recipients, Hanwoo)

서 론

수정란의 체외 발달에 영향을 미치는 요인으로는 난소의 운반시간 및 온도, 난포란의 채취 방법, 체외 성숙 시간, 배양액의 조성, 체외 성숙시 공배양 등이 보고되고 있다(Crister 등, 1986; Sirard 등, 1988; Fukui 및 Ono, 1989; Ward 등, 2002).

한편, 포유동물의 초기배는 특정 발달 단계에서 배발육이 정지되는 'cell block' 현상이 나타나는데, 이것은 모체 계놈에 의한 단백질 합성이 배아 계놈으로 이행되는 단계에서 나타나며, 마우스는 2세포기, 돼지는 4세포기, 면양과 소는 8~16세포기이다. 이러한 발육 중지 현상이 체내에서는 나타나지 않고, 체외에서만 발생하는 원인은 체외 배양 조건이 배발달에

* Correspondence : E-mail : jinrho@gnu.ac.kr

요구되는 배양환경을 충족시키지 못하기 때문일 것이다. 따라서 난구세포(Chen 등, 1992)나 난관상피세포(bovine oviduct epithelial cell; Behboodi 등, 1995)와 같은 체세포와 공배양, Ca과 P의 첨가 및 삼투압의 조절로 발육 정지 현상을 극복할 수 있었다. 소 체외 수정란의 발생을 유도하기 위한 배양액으로는 중탄산염(HCO₃)으로 완충된 TCM-199(Katska 등, 1995; Hasler, 2000)가 일반적으로 이용하고 있으나, 체세포와의 공배양이 필수적이다. 한편, CR1aa, HECM, CZB, 합성난관액(synthetic oviduct fluid; SOF; Rorie 등, 1994; Carolan 등, 1995) 등과 같은 체세포와 공배양이 필요하지 않은 배양액들이 개발되어 이용되고 있다.

혈청의 원료는 fetal calf serum(FCS)이나 oestrus calf serum(OCS) steer 혈청, 과배란된 암소의 혈청, 발정전기 혈청 등이 사용되었다. Younis 등(1989)은 발정 전기의 소 혈청이 OCS에 비하여 FCS가 더 효과적이라고 하였다. 그러나 혈청에서 배양된 체외 수정란을 이식하였을 때 과체중의 새끼가 태어나 난산발생이 증가하고 있어 혈청을 이용하지 않는 무혈청 배양액의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 한편, 혈청은 체외 수정 후 초기 발달에 있어서는 세포 분열을 억제하지만 후기 단계에서는 필수적이라 하였다(Pinyopummintr 등, 1994; Massip 등, 1996). 또한, 혈청의 첨가 유무와 첨가되는 혈청량에 따라서 배 발달율(Thibodeaux 등, 1995; Carolan 등, 1995)과 이식 후 수태율(Massip 등, 1996; Hasler, 2000; Hoshi, 2003), 산자 생산(Numabe 등, 2000)에 영향이 있었다.

따라서 본 실험은 상업적으로 이용 가능한 체외 배양액 (IVMD 101 및 TCM-199)에서 혈청 첨가에 따른 소 수정란의 생산과 이를 이용한 산업화 즉, 수정란 이식의 효율성을 향상시키고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 체외 성숙

도축 한우의 난소를 0.075 g/l penicilline(Sigma G3035, U.S.A.)이 첨가된 0.9% NaCl solution(24~27℃)이 들어있는 보온병에 담아 도축 후 6시간 내에 실험실로 운반하였다. 운반된 난소는 0.9% NaCl solution으로 3회 세척하여 혈액과 이물질을 제거하였다. 형태적으로 이상이 없는 난소에서 18G 주사 바늘이 부착된 20 ml 주사기를 이용 직경 2~8 mm의 가시난포에서 난포액을 흡입하여 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 HEPES가 함유된 TCM-199 용액으로 2~3회 세척한 후 난구세포가 부착된 세포질이 치밀한 난포란만을 선별하여 실험에 공시하였다. 난포란의 체외 성숙은 IVMD101(IFP, Japan) 배양액 220 ul가 들어 있는 6-well plate(IFP, Japan)에 난포란 20~25개를 넣고 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 22~24시간 동안 실시하였다.

2. 체외 수정

한우 동결 정액(KPN 338) 1개를 실온에서 10초간 방치한 후 38℃ 온수에서 20초간 용해하였다. 15 ml 원심 분리관(Corning, U.S.A.)의 상층에 2 ml 90% percoll(Sigma, U.S.A.), 하층에 2 ml 45% percoll을 분주하고 90% percoll 상층부에 용해된 정자를 조심스럽게 첨가하여 700 g에서 20분간 원심 분리하였다. 하층부의 정자피만을 분리하여 2 ml 체외 수정용 배양액인 IVF-100(IFP, Japan) 배지에 혼합하여 다시 350 g, 5분간 세척하였다.

체외 성숙된 난포란을 체외 수정용 배양액으로 2회 세척한 후 mineral oil이 피복된 46 ul 체외 수정용 배양액에 각 20~25개씩 난포란을 넣고, 정자 농도가 1~2×10⁶ sperms/ml로 조정하여 39℃, 5% CO₂ 배양기에 6시간 동안 배양하여 체외 수정을 유도하였다.

3. 체외 배양

체외 수정된 수정란(배양 1일째)을 IVMD101(0% FBS)로 2~3회 세척한 후 6-well plate에 20~25개씩 넣어 39℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액은 배양 후 48시간마다 50%의 신선한 배양액으로 교체하였으며, 배양 2일째 분할율과 배양 7일째에 배반포 수정란 발달율을 조사하였다. 본 실험에 사용한 체외 배양용 배양액은 TCM-199(5% FBS), IVMD 101(5% FBS) 및 IVMD101(0% FBS)이다.

4. 배반포의 이중 형광 염색

배반포의 세포수와 내부 세포피의 비율을 조사하기 위하여 propidium iodide(PI; Sigma, U.S.A.)와 bis-Benzimide(Sigma, U.S.A.)를 사용하여 이중 형광 염색(differential staining)을 실시하였다. 각각의 실험 조건에서 발생한 체외 배양 7일째 배반포를 0.5% pronase(Sigma, U.S.A.)로 약 30초간 처리하여 투명대를 용해시킨 후 PBS로 3~4회 세척했다. Rabbit anti-pig whole serum(Sigma, U.S.A.)이 1:5로 희석된 PBS 용액에서 40분간 배양한 후 PI와 bis-Benzimide가 각각 4 ug/ul 첨가되고, guinea pig complement(Sigma, U.S.A.)가 1:10으로 희석된 PBS 용액에서 40분간 배양하여 염색하였다. 염색된 배반포를 PBS 용액으로 3~4회 세척한 후 petri-dish에 올려 slide glass로 수정란을 살짝 눌러서 세포가 고루 퍼져있는 상태에서 형광 현미경(Nicon, Japan)으로 배반포의 내부 세포피 및 영양 세포층의 세포수를 각각 조사하였다. Bis-benzamide에 염색되어 푸른색을 띠는 핵은 내부세포피, PI에 염색되어 핑크색을 띠는 핵은 영양 세포층으로 평가하였다.

5. 수정란 이식 및 임신 진단

수란우는 경상북도 지역에서 사육중인 젃소 미경산우와 경산우를 각각 사용하였다. 수란우의 발정은 자연 발정 또는 발정 유도를 하였고, 발정이 확인된 수란우는 이식 전에 직장 검

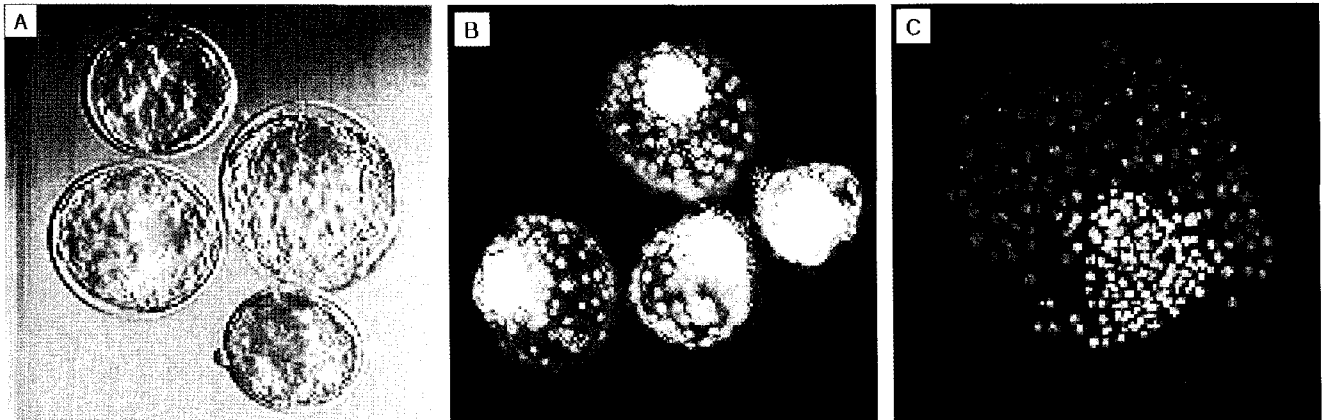


Fig. 1. Bovine Day-7 embryos developed to blastocyst stage cultured in IVMD101 supplemented with 5% FBS. A: expanded blastocysts. B and C: differential staining of blastocysts.

사를 통하여 황체가 형성된 것만을 사용하였다. 실험 조건에 따라 생산된 수정란은 10% FBS 첨가 TCM-199가 들어있는 0.25 ml 스트로에 장착하여 37~39°C 상태로 3시간 내에 운반하여 이식에 재공하였다. 수정란 이식은 황체가 있는 자궁 각 선단부에 비외과적으로 이식하였다. 수정란 이식 후 15일 경에 발정이 재귀되지 않은 소를 1차적으로 확인한 다음, 이식 후 60일경에 직장 검사를 통해서 임신 여부를 확인하였다.

6. 통계 처리

배 발달율 및 세포수는 Mean±SD로 나타냈고, ANOVA(분산분석)의 Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, 임신율은 χ^2 -test를 이용하여 유의차를 검정하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의차를 분석하였다.

결 과

1. 체외 배양액 및 혈청의 효과

한우 2세포기 수정란의 체외 발달에 있어서 체외 배양액 및 혈청의 효과를 검토한 결과는 Table 1과 같다. 배반포 발달율이 IVMD101(5% FBS)군이 34.2%로서, TCM199(5% FBS) 및

IVMD101(0% FBS)군의 26.8% 및 25.9%에 비하여 유의하게 높았다($p < 0.05$). 배반포의 발생이 IVMD101(5% FBS)군은 체외 배양 6일째 12.9%가 형성되어 다른 군의 0.2~2.3%에 비하여 유의하게 빨랐다($p < 0.05$). 특히 5% FBS 첨가군의 배반포 도달 일령이 0% FBS 첨가군에 비하여 빠른 경향이었다.

2. 배반포의 세포수

서로 다른 체외 배양액 및 혈청 첨가 조건에서 생산된 배반포의 품질을 평가하기 위하여 세포수를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 서로 다른 배양액 및 혈청 첨가 조건에서 생산된 배반포의 ICM 및 TE 세포수는 각각 평균 36.0~44.7개 및 평균 83.3~106.7개로서 차이가 없었다. 그러나 총 세포수는 IVMD101군의 5% FBS 및 0% FBS군이 각각 평균 150.0 및 142.7개로서 TCM199(5% FBS)군의 평균 120.3개보다 유의하게 많았다($p < 0.05$).

3. 배양 체계에 따른 임신율

서로 다른 체외 배양액 및 혈청 첨가 조건에서 생산된 배반포를 이식한 젖소 수란우의 임신율은 Table 3과 같다. 임신율이 IVMD101(0% FBS)군이 28.6%로서, 혈청 첨가군인 TCM

Table 1. The effect of culture media and serum on the development of 2-cell stage embryos to blastocyst stage of *in vitro* produced bovine embryos

Treatments	No. 2-cell embryos	Blastocyst	Day of embryos development to blastocyst (%)		
			6	7	8
TCM-199 (5% FBS)	398	107 (26.8±3.5) ^b	9 (2.3) ^b	54 (13.6)	44 (11.1)
IVMD101 (5% FBS)	364	127 (34.2±3.3) ^a	47 (12.9) ^a	53 (14.6)	27 (7.4)
IVMD101 (0% FBS)	432	106 (25.9±3.7) ^b	1 (0.2) ^b	24 (5.7)	81 (18.8)

^{a~c} Superscripts are significantly different $p < 0.05$, Mean±S.D.

Table 2. The effect of culture media and serum on the cell numbers of inner cell mass, trophoctoderm and total in *in vitro* produced bovine blastocysts

Treatment	No. of blastocysts	No. (%) of cells		
		Total	Inner cell mass	Trophoctoderm
TCM-199 (5% FBS)	12	120.3± 8.3 ^b	36.3±14.6 (30.2)	83.3±21.6 (69.2)
IVMD101 (5% FBS)	13	150.0±23.7 ^a	44.7± 7.9 (29.8)	105.2±19.2 (70.2)
IVMD101 (0% FBS)	11	142.7±23.8 ^a	36.0±14.5 (25.2)	106.7±17.3 (74.7)

^{a,b} superscripts are significantly different $p<0.05$, Mean ± S.D.

Table 3. The effect of culture media and serum on the pregnancy rates of *in vitro* produced bovine blastocysts

Source of embryos	No. of transferred recipients	No. of pregnant recipients	Pregnant rate (%)
TCM-199 (5% FBS)	291	93	32.0
IVMD101 (5% FBS)	407	138	33.9
IVMD101 (0% FBS)	70	20	28.6

199(5% FBS) 및 IVMD101(5% FBS)군의 32.0% 및 33.9%에 비하여 낮은 경향이었으나, 유의차는 인정되지 않았다.

4. 배 발생 일자에 따른 임신율

서로 다른 배양액 및 혈청 첨가 배양액에서 생산된 배반포의 발생 일자에 따른 임신율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. IVMD 및 TCM199 배양액과 혈청 첨가에 따라 생산된 배양 6, 7 및 8일째 한우 체외 수정란을 768두의 젖소 수란우에 이식한 결과, 임신율이 36.7%, 31.1% 및 30.1%로서 차이가 없었다. 한편, 동일한 발생 일령에서 배양액의 차이에 따른 임신율도 비슷한 경향이였다.

5. 배반포의 수량에 따른 임신율

IVMD101(5% FBS)군에서 생산된 배양 6일째 배반포를 각각 1개 또는 2개를 젖소 미경산우 및 경산우 수란우에 이식한 결과는 Table 5와 같다. 배반포 1개가 이식된 수란우의 임신율이 31.4%로서, 배반포 2개가 이식된 수란우의 41.9%에 비하여 유의하게 낮은 경향이였다($p<0.05$). 한편, 배반포 1개가 이식된 수란우에서 미경산우의 임신율(35.1%)이 경산우(15.4%)에 비하여 높은 경향이였으나 유의차는 없었다. 배반포 2개가 이식된 경산우와 미경산우 수란우의 수태율은 비슷한 경향이였다.

6. 이식일자에 따른 임신율

발정 후 6일, 7일 및 8일째의 수란우에 IVMD101(5% FBS)

Table 4. The effect of developed day of blastocysts on the pregnancy rates of *in vitro* produced bovine blastocysts

Culture day of blastocysts	Source of embryos	No. of recipients	Pregnancy %
6	TCM-199 (5% FBS)	52	17 32.7
	IVMD101 (5% FBS)	187	71 38.0
	IVMD101 (0% FBS)	12	4 33.3
	Total	251	92 36.7
7	TCM-199 (5% FBS)	145	47 32.4
	IVMD101 (5% FBS)	170	55 32.4
	IVMD101 (0% FBS)	29	5 17.2
	Total	344	107 31.1
8	TCM-199 (5% FBS)	94	29 31.4
	IVMD101 (5% FBS)	50	12 24.0
	IVMD101 (0% FBS)	29	11 37.9
	Total	173	52 30.1

^{a,b} $p<0.05$, Mean±S.D.

군에서 생산된 배양 6일째 수정란 2개를 이식한 결과는 Table 6과 같다. 발정 후 7일 및 8일째 수란우의 임신율이 46.9 및 40.0%로서 발정 후 6일째의 20.0%에 비하여 높은 경향이였으나 유의차는 없었다.

고 찰

혈청은 각종 호르몬, 영양분과 성장 인자를 함유하고 있어 발달을 촉진하는 작용을 한다. 혈청은 체외 수정 후 초기 배 발달에서는 세포 분열을 억제하지만, 후기배 발달에 필수적인 요소이다(Pinyopummintr 등, 1994; Thibodeaux 등, 1995; Carolan 등, 1995; Massip 등, 1996). Hasler(2000)는 B2 배지에

Table 5. The effect of the blastocyst number on the pregnancy rate after transferring *in vitro* produced bovine blastocysts

No. of embryos	Recipient	No. of transferred recipient	No. of pregnant recipient	Pregnant rate (%)
1	Heifer	57	20	35.1 ^a
	Cow	13	2	15.4 ^a
	Total	70	22	31.4 ^a
2	Heifer	89	38	42.7 ^b
	Cow	28	11	39.3 ^b
	Total	117	49	41.9 ^b

^{a,b} Superscripts are significantly different $p < 0.05$, Mean \pm S.D.

Table 6. The effect of transferred day in recipients on pregnancy after transferring *in vitro* produced bovine blastocysts

Day of estrus	No. of recipients	Pregnancy	%
6	10	2	20.0
7	64	30	46.9
8	43	17	40.0

서 배 발달율이 10% FCS 첨가구에서 35.4% 였고, 무 첨가구는 36.9%로 비슷하였고, Yamashita 등(1999)은 TCM-199(5% FBS)에서의 25.1%의 배발달율을 보고하여 본 연구의 결과(Table 1)와 비슷한 경향이였다.

SOF 배지에 10% FCS 첨가구의 6일째 배반포 발달율이 19.1%, 무 첨가구가 7.1%로 높은 경향이였고(Gutierrez-adan 등, 2000), Carolan 등(1994)도 혈청 첨가구의 6일째 배반포 발달이 21%로 무첨가구 12%보다 유의하게 높았다. 본 실험에서도 IVMD101(5% FBS)에서 배양 6일째 12.9%가 형성되어 다른 군의 0.2~2.3%에 비하여 유의하게 빨랐다($p < 0.05$). 특히 5% FBS 첨가군의 배반포 도달 일령이 0% FBS 첨가군에 비하여 빠른 경향이였다.

수정란 이식을 위한 배반포의 품질 평가는 일반적으로 현미경상에서 형태만을 고려함으로써 주관적인 평가에 의존하고 있어 객관적인 평가 체계가 부족하다. 본 연구에서는 배반포의 세포수를 조사하여 수정란의 품질 평가를 하고자 하였다. Yamashita 등(1999)은 IVMD101(0% FBS)에서 7일째 배반포 세포수가 179.5개와 5% FBS 첨가한 TCM-199는 145.7개로서, 본 연구에서 조사한 IVMD101 결과(Table 2)보다 높았으며, 혈청이 첨가된 군과 비슷한 결과였다. 10% FCS 첨가한 SOFaa에서 배반포수가 120개로 TCM-199와 거의 유사하게

나왔으나, 3 mg/ml BSA 첨가한 SOF는 다소 높은 138개를 보고하여(Thompson 등, 1998), 수정란의 배양에 사용되는 배양액과 첨가물에 따라 수정란의 세포수는 차이를 보였다. Fouladi-Nashta 등(2005)도 혈청을 첨가하였을 때 총 세포수는 증가하였으나, ICM 비율이 감소하는 등, 배양액의 종류와 혈청의 첨가에 따라 배 발달율과 총 세포수 및 ICM 비율이 차이가 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 배양액에 따른 총 세포수의 차이가 인정되었으나, 혈청 첨가에 따른 효과는 없었다.

체의 수정란의 수태율은 체내 수정란보다 낮은 것으로 보고하고 있고, 수정란의 체외 배양 체계와 생산 일자에 따른 수태율의 차이가 보고되고 있다(Hasler 등, 1995). 10% FCS 첨가한 TCM-199 배양액의 수태율이 50.4%이었고, BRL 공배양 조건에서 배양 초기 3일간 혈청의 첨가 및 미첨가시 수태율이 47.1~47.8%로서 배양 초기에 혈청의 첨가와 배양 체계에 따른 수태율의 차이는 없음을 보고하였다(Hasler, 1995). 본 연구에서도 5% FBS가 첨가된 IVMD101 배지에서 6일째 생산된 수정란의 이식 수태율이 38.0%로 가장 높았으나, 혈청 첨가에 따른 수태율의 차이는 없었다(Table 4). 한편, SOF 배양액에 10% FCS와 BRL 공배양한 배반포의 수태율이 각각 37.2%와 41.8%였고(Van Wagendonk-de Leeuw 등, 2000), BOEC 공배양된 M199 배양액에 혈청 첨가 유무에 따라 수태율이 20%와 32%이며, GC 공배양 배반포의 수태율은 40%로서 배양액 종류와 혈청 첨가에 따른 수태율의 차이를 보고하였다(Massip 등, 1996). Hoshi(2003)는 5% CS 첨가된 HPM-199의 이식 수태율이 32.8%이고, IVD 101/IVMD101을 이용한 무혈청 배지에서 39.6%를 보고하였고, 본 연구의 결과(Table 3)에서 수태율의 차이는 보이지 않았지만, 배반포가 많이 생산된 일자에 더 높은 수태율(Table 4)을 확인할 수 있었다.

10% FBS 첨가되고 BRL세포가 공배양된 B2 배양액에서 생산된 초기와 확장 배반포의 수태율은 31%, 배반포기는 35%였고, 이들 배반포 중에서 1등급 수정란을 Day 7일과 8일째로 분류하여 이식한 결과, 7일째 수태율이 59%로 8일째 48%보다 더 높았으며, 등급이 낮은 그룹에서도 7일째의 수태율이 더 높았다(Hasler 등, 1995). 본 연구의 IVMD101(5% FBS)에도 동일한 결과를 얻었으며, 6일째 수정란의 수태율이 38.0%로 가장 높았다(Table 4).

Franco 등(2006)은 체외 수정란을 홀스타인 경산우에서 배반포 1, 2개를 이식한 수태율은 57%, 50%이며, 미경산우는 41%, 20%로 경산우에 비해서 더 낮은 경향으로 본 결과와는 반대의 결과였다(Table 5). 그러나 Agca 등(1998) 및 Numabe 등(2000)은 1개보다는 2개 이식하였을 때 유의하게 높은 수태율을 보고하여 본 연구와 유사한 경향이였다. 한편, Sakaguchi 등(2002)은 수정란을 1, 2 및 3개 이식하였을 때 수태율이 63%, 60% 및 71%였으나, 분만율이 63%, 57% 및 45%로서 2개 이상의 배반포를 이식하면 수태율은 높지만 유산율이 높아지는

문제점이 있다고 하였다.

Hasler 등(1995)은 체외 수정 후 7일째 수정란과 수란우의 발정 동기화가 ± 1 일 이내는 수태율에 차이가 없었고, +2일 때에는 수태율이 낮은 경향을 보였다고 하였다. 수란우와 공란우의 발정 동기화가 일치할수록 수태율이 높다는 보고(Newcomb, 1975)와 수정란과 수란우의 동기화가 -1일 때 수태율이 가장 높다는 보고를 하였는데(Putney 등, 1988), 본 연구에서는 수란우의 발정 후 7일과 8일째에 배반포 이식의 수태율이 46.9% 및 40.0%로서 6일째의 20.0%보다 높은 경향으로(Table 6), 이전의 연구와 차이가 있었다. 이런 차이는 배양 6일째 생산된 배반포를 이식에 사용하였기 때문인 것으로 사료된다.

본 연구에서 IVMD101(5% FBS) 배양액에서 배 발달율이 가장 높게 나타났으며, 배반포 발생이 빠른 경향이었다. 또한, 배반포의 품질을 나타내는 총 세포수는 TCM199 배양 체계에 비해서 더 많았고, 이 배양액에서 생산된 6일째 수정란으로 이식하였을 때 수태율이 다른 일자에 생산된 수정란에 비해서 더 높았다. 수란우의 산차는 미경산우가 경산우에 비해서 더 높은 수태율을 보였으며, 수정란의 이식수량은 1개보다는 2개를 이식할 경우가 더 높은 결과를 얻었다. 위의 수정란과 수란우의 조건을 고려한다면 보다 높은 이식 수태율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Agca Y, Monson RL, Northey DL, Abas Mazni O, Schaefer DM and Rutledge JJ. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: Normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology* 50:147-162.
- Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, Cargill SL, Kreisler BR, Medrano JF and Murray JD. 1995. Birth of large calves that developed from *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology* 44:227-232.
- Carolan C, Lonergan P, Van Langendonck A and Mermillod P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 43:1115-1128.
- Chen TT, Lane TA, Doody MC and Caudle MR. 1992. The effect of peritoneal macrophage-derived factor(s) on ovarian progesterone secretion and LH receptors: the role of calcium. *Am J. Reprod. Immunol.* 28:43-50.
- Critser ES and First NL. 1986. Use of a fluorescent stain for visualization of nuclear material in living oocytes and early embryos. *Stain. Technol.* 61:1-5.
- Fouladi-Nashta AA, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell KH and Webb R. 2005. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod. Biomed. Online* April 10(4):497-502.
- Franco M, Block J, Jousan FD, de Castro e Paula LA, Brad AM, Franco JM, Grisel F, Monson RL, Rutledge JJ and Hansen PJ. 2006. Effect of transfer of one or two *in vitro*-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology* 66:224-233.
- Fukui Y and Ono H. 1989. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for *in-vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 86:501-506.
- Gutierrez-adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP and Pintado B. 2000. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 55:1117-1126.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JE and Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-153.
- Hasler JF. 2000. *In vitro* culture of bovine embryos in Menezes's B2 medium with or without co-culture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 60:81-91.
- Hasler JF. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 79:245-264.
- Hoshi H. 2003. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59:675-685.
- Katska L, Rynska B and Smorag Z. 1995. The effect of co-culture system on developmental capacity of bovine IVM/IVF oocytes. *Theriogenology* 43:859-870.
- Massip A. 1996. Vitrification: a cryopreservation method useful for mammal embryos. *Contracept Fertil. Sex* 24:665-673.
- Newcomb R and Rowson LEA. 1975. Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J. Reprod. Fertil.* 43:539-541.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T and Horiuchi T. 2000. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of *in vitro* or *in vivo* produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 64:13-20.
- Pinyopummintr T and Bavister BD. 1994. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of

- type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 41:1241-1249.
- Putney DJ, Thatcher WW, Drost M, Wright JM and DeLorenzo MA. 1988. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the United States. *Theriogenology* 30:905-922.
- Rorie RW, Lester TD, Miller GF, Gliedt DW and McNew RW. 1994. Effects of protein source and co-culture on bovine embryo development in synthetic oviductal fluid medium. *Theriogenology* 42:385-395.
- Shakaguchi M, Geshi M, Hamano S, Yonai M and Nagai T. 2002. Embryonic and calving in bovine mixed-breed twins induced by transfer of *in vitro*-produced embryos to bred recipients. *Anim. Reprod. Sci.* 72:209-221.
- Sirard MA, Parrish JJ, Ware CB, Leibfried-Rutledge ML and First NL. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39:546-552.
- Thibodeaux JK, Myers MW, Prough SG and White KL. 1995. Effect of a serum extender containing growth factors on development of IVM and IVF bovine embryos. *Theriogenology*, 44:423-432.
- Thompson JGE, Allen NW, McGowan LT, Bell ACS, Lambert MG and Tervit HR. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology* 49:1230-1249.
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos APW, Merton JS, den Daas JHG, Kemp B and de Ruigh L. 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53:575-597.
- Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M and Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57:2105-2117.
- Yamashita S, Abe H, Itoh T, Satoh T and Hoshi H. 1999. A serum-free culture system for efficient *in vitro* production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 31:123-131.
- Younis AI, Brackett BG and Fayerer-Hosken RA. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23:189-201.

(접수일: 2008. 3. 17 / 채택일: 2008. 3. 25)